

„Rheology of Hyaluronan Solution“

Mgr. Helena Bilerová

Předložená disertační práce Mgr. Heleny Bilerové se zabývá studiem fyzikálních vlastností roztoků kyseliny hyaluronové (HA) v závislosti na složení roztoku a vnějších podmínkách. Práce představuje také výsledky spolupráce s holdingem Contipro Group, odkud pochází výchozí surovina HA pro studované vzorky a kde byla provedena část měření. Porovnání experimentálních výsledků z více metod umožnilo i obecnější vyhodnocení shrnuté v závěru této studie.

Práce je rozdělena do pěti kapitol.

1. Introduction nejprve stručně uvádí chemické složení a strukturu HA a v obecné rovině uvádí také její biologické funkce. V druhé polovině jsou zřetelně uvedeny cíle práce, které jsou zaměřeny na fyzikální vlastnosti širokého rozsahu molekulových hmotností HA v roztoku. Konkrétně, experimenty jsou vedeny s cílem získání i) popisu chování HA řetězců v roztoku, ii) teplotní stability vodných roztoků a iii) rozpustnosti a následné časové stability samotné HA v roztoku. Z hlediska závěrečného posouzení splnění cílů a úrovně přínosu disertační práce to poněkud ztěžuje roli pro oponentský posudek, protože takto definované cíle nejsou příliš konkrétní. Není zde uveden stav poznání v této problematice a aktuální požadavek nebo důvody k řešení právě těchto témat (tvrzení „důležité pro mnoho aplikací“ je nedostačující).

2. Theoretical Background uvádí literární rešerši popisující chemickou strukturu HA v pevné fázi (charakterizované pomocí rentgenové difraktometrie) a při rozpuštění ve vodném roztoku (teoretické modely chování).

Ve stěžejní teoretické části zabývající se teorií reologie jsou základní veličiny pro tuto práci (rychlost smykové deformace a smykové napětí) definovány velmi stručně. Ilustrace na obrázku fig. 9 tyto veličiny neuvádí (chybně je zde uvedena síla jako skalární veličina). Upravený Newtonovský viskózní zákon v rovnici eq. 1 zavádí dynamickou viskozitu, přitom by bylo vhodné zapsat i dynamický člen, tj. časovou změnu smykové deformace. Rovnice eq. 1 až eq. 6 jsou uvedeny bez odvození, odkazu na zdroj a bez bližších komentářů objasňujících jejich význam. Autorka také nediskutuje další předpoklady (např. nutné dodržení shodného směru působící síly a měřené deformace) a konkrétní praktické využití jednotlivých veličin. Celá tato část (stěžejním materiálem pro zpracování experimentálních výsledků) je velmi stručná a nedostatečně popisná na to, aby si oponent vytvořil představu o šíři teoretických znalostí autorky v hlavním oboru její práce. Je velice škoda, že autorka neuvádí shrnutí teoretické části z pohledu cílů disertační práce.

3. Experimental Part v této části jsou tabulkovou formou přehledně vypsány výchozí šarže HA a ostatních použitých látek. Dále jsou stručně a věcně představeny použité měřicí přístroje pro analýzu vzorků, pravděpodobně řazeny podle významu pro tuto práci (reometr, zetasizer, NMR, atd.), následují použité metody přípravy jednotlivých vzorků.

Použité přístroje jsou popsány spíše z pohledu konstrukčního, není diskutováno, proč je konkrétní přístroj vhodný „pro charakterizaci roztoků HA“, jak je bez dalšího vysvětlení uvedeno v tvrzení v pododstavci 3.1.3.2. Popis techniky postrádá bližší principiální vysvětlení dané měřicí metody, co se daným přístrojem měří za veličinu, charakteristiku, za jakých podmínek, jaká je nutná příprava vzorku, apod. a alespoň v obecné rovině by bylo vhodné diskutovat nejčastější zdroje chyb měření. Přehledně a pečlivě jsou zpracovány přípravy jednotlivých vzorků s individuální historií rozpouštění, míchání a skladování.

V závěru kapitoly jsou trochu nelogicky zařazeny výhradně teoretické reologické modely. Poslední odstavec 3.1.5 shrnuje statistické údaje a pouze z jedné věty se dozvídáme o relativních chybách měření (číselně pouze u dvou veličin, tokových charakteristik a měřené teploty). Statistické výpočty doplňuje celá příloha (kapitola 8), z které ale nevyplývají jasné závěry.

4. Results and Discussion Tato kapitola postupně a přehledně představuje výsledky tokových charakteristik v závislosti na chemické struktuře HA, vlastnostech roztoku a vnějších podmínkách. Na závěr jsou řazeny výsledky dalších doplňujících analýz a časová stabilitní studie. Již podle vytyčených cílů v úvodní části je zřejmé, že v odstavcích 4.1 až 4.4 (a 4.6) je soustředěn hlavní záměr této práce a vlastní příspěvek autora. Bohužel i v této části se autorka dopustila několika zbytečných nepřesností.

Jak bylo v práci již dříve uvedeno, roztok HA je ne newtonovskou kapalinou a pro takové kapaliny se používá jiné terminologie v popisu viskozity. Respektive hovoříme o zdánlivé (aparentní) viskozitě, nikoliv o dynamické viskozitě jako o konstantním látkovém parametru newtonovských kapalin.

Graf na obrázku fig. 28 je méně přehledný. Popisky jednotlivých dat jsou nejednoznačné. Téměř zbytečně se uvádí teplotní křivky nastavené a zaznamenané přístrojem, přitom uvedení rychlosti ohřevu poskytne dostatek informací. Tvrzení, proč byla vybrána rychlost ohřevu 4°C/min není z komentáře u grafů evidentní. Pro toto tvrzení by bylo vhodné zvolit jiný průběh zahřívání, tj. například po ukončení nárustu teploty setrvat na její konstantní hodnotě a pak s jistou strmostí teplotu opět snižovat. Při opakovaných cyklech (maximální nastavená teplota se při každém cyklu zvyšuje) by se zřetelně prokázalo, které teploty způsobí vratné změny v konformaci HA řetězců, a od které teploty již dochází k nevratným degradacím HA.

Tvrzení o výběru nejvhodnějšího rozsahu rychlostí smykové deformace (na str. 49, dole) nekoresponduje s naměřeným výsledkem na obrázku fig. 27. V popisku u

obrázku fig. 29 je popsán „první Newtonovský region“, přitom se jedná již o druhé Newtonovské plato (srovnej, viz fig. 14 na straně 27). Z křivek uvedených na obrázku fig. 30 není zcela zřejmé, že při rychlosti smykové deformace 1000 s^{-1} dochází ke snížení viskozity vlivem degradace vzorku, jak je uvedeno v textu nad obrázkem. Toto tvrzení si vyžaduje bližší komentář.

Na grafu v obrázku fig. 31 by bylo vhodné vyznačit vypočtené hodnoty dynamické viskozity při nulové smykové rychlosti η_0 a také rozhraní mezi lineárním newtonovským modelem a nelineárním modelem Crosse. Je škoda, že mezní hodnota (kritické smykové napětí γ^*) je stručně definováno až dále (jaký pro ni platí pravidla, vztah?), v komentáři ke grafu na obrázku fig. 34.

Vyhodnocení závislostí uvedených v grafu na obrázku fig. 32 je pouze popisné. Výčet konkrétních strmostí by výsledky zpřehlednil, navíc křivky pro dvě největší M_w nelze prokládat přímkou, což ale zmiňuje komentář.

Komentář k výsledkům zaznamenaným do grafu na obrázku fig. 35 je pouze konstatováním již známých a očekávaných faktů (s vyšší koncentrací a molekulovou hmotností vzrůstá dynamická viskozita) bez hlubší analýzy a obecnějších závěrů.

Uzavřít zhodnocení výsledků tím, že „(výsledky) jsou z praktického pohledu důležité, protože některé studie jsou zaměřeny na...“ něco jiného, není příliš šťastná formulace (viz první odstavec na straně 64, poslední věta).

Vyhodnocení výsledků uvedených na obrázcích fig. 36 a 37 je zcela v pořádku, neboť je zde dosaženo dobré shody s výsledky uvedenými v citované literatuře. Přesto použitý násobek dvou veličin na horizontální ose grafu obrázku fig 36 by bylo vhodné okomentovat (Proč toto zavádíme? K čemu je to dobré?).

Závěry a vysvětlení v odstavci 4.4.1 „vlivem změn konformací řetězců“ je nedostatečné, hlubší rozbor by byl vítán. Z experimentálních výsledků není zřejmé, že by při $T > 60^\circ\text{C}$ docházelo k degradaci HA, jak je zde konstatováno.

Komentář k obrázku fig. 42 popisuje křivky dynamické viskozity HA rozpuštěné ve vodě s „malým nárustem...“ a vysvětlením je důvod „jsou utvářeny nějaké organizované struktury“. Nejedná se o nárůst, ale spíše o vyrovnání charakteristiky, kdy při zvyšování teploty již k žádným změnám nedochází. Při vyšší M_w se řetězce HA postupně „choulí“ do klubíčka v celém rozsahu teplot. Pro menší M_w HA se nad $50\text{--}60^\circ\text{C}$ křivka vyrovná a ke změnám již nedochází. Při dalším zvyšování teploty se pravděpodobně projevuje skutečně vysoká teplota blížící se varu, dochází k expanzi klubek u roztoků s menší M_w . U roztoků s vyšší M_w , tj. vyšší hustotou, se tento jev neprojevuje. Podrobný rozbor těchto zajímavých experimentálních dat by byl vítán. Chování roztoků by vhodně doplnilo měření hustoty v závislosti na teplotě.

Další experimentální metody jsou spíše doplňkové k reologickým měřením. Např. NMR poskytne informaci o kontaminaci vzorků, jejichž vliv na reologické vlastnosti

jsou zanedbatelné.

Experimentální výsledky jsou v této kapitole logicky řazeny, vhodně navazují a jsou doplněny věcným komentářem. V některých případech, jak je uvedeno výše, je postrádána hlubší analýza výsledků a podrobnější konfrontace s teoretickými předpoklady studovaného chování HA.

5. Conclusion nejprve stručně shrnuje dosažené cíle disertační práce. Teplotní závislosti, které neuvádí dostupná literatura, jsou hlavním přínosem této práce. Přehledně jsou uvedeny další poznatky přinášející praktický význam z oblasti výroby a zpracování HA.

Formální zpracování disertační práce.

Celý odstavec 2.3.2.1 je převzat z návodu reometrického přístroje (není nutné se v textu dále odkazovat na tento manuál), odstavec nepřináší významné teoretické poznatky k hlavnímu tématu řešené problematiky, proto se do této kapitoly nehodí (lépe je ho uvést v experimentální části práce). Obdobně to platí i pro podkapitoly 2.4 a 2.5.

Naopak pododstavec 3.1.4.3 uvádí výhradně teoretické modely popisující chování zaznamenaných tokových charakteristik, které by krásně doplnilo odstavec 2.3.1 v teoretické části disertační práce (namísto kapitoly 3 věnované materiálům a metodám).

Jednotlivé modely (na str. 45) a rovnice eq. 14 (ta je pouhým přepisem eq. 1) až eq. 17 jsou bez odvození nebo odkazu na zdroj. Konstanty uvedené v rovnici eq. 16 pro model Crosse by bylo vhodné ilustrovat na konkrétní křivce. Též by bylo vhodné uvést, který model chování lze očekávat jako nejvhodnější pro popis chování HA v roztoku. Mezní hodnoty kritického smykového napětí uvádějící rozmezí mezi lineárním a nelineárním modelem jsou zmíněny později na str. 58.

Ne příliš vhodné pro čtenáře je uvedení seznamu zkratk a veličin v jediném seznamu na konci zprávy, oproti uvedení významu vždy za prvním použitím dané zkratky nebo symbolu. Navíc v textu mají některé symboly dvojí smysl, což seznam nerespektuje. Jedná se o symbol λ , který označuje vlnovou délku v 2.4.1 a iontovou vodivost v 2.5.1, F sílu v 2.3.1 a Faradayovu konstantu v 2.5.1, T momentovou sílu v 2.3.2.1 a teplotu v 2.5.2.

Poměry dvou veličin uvedených v eq. 9 a eq. 10, nejsou rovnicemi. Jde, doufejme o překlep.

Fotografie uvedená na fig. 19 se do publikace tohoto typu příliš nehodí. Jako jediná doplňuje objasnění diskutované vlastnosti látek a příliš nezapadá do kontextu.

Rovnice eq. 12 a eq. 13 jsou uvedeny bez odkazu na původní zdroj, odkud byly převzaty.

V komentáři k obrázku fig. 33 jsou nově uváděny poznatky z dostupné literatury, které patří do teoretické části (nově také zavedeny veličiny c^* , c_e , eq. 18). Z textu není jasné, co se dosazuje do jednotlivých součtových členů rovnice eq.18. Bylo by vhodné uvést ilustrující příklad výpočtu. Není uvedeno z jakých důvodů a která konkrétní data jsou prokládána dvěma lineárními křivkami na obrázku fig 33.

Na straně 57, v druhém odstavci je odkaz na literaturu s číslem 84, který je evidentně chybný. Na straně 59 je na publikaci těchto autorů opět odkazováno, ale bez uvedení pořadového čísla článku v seznamu použité literatury.

V práci je zřídka využíváno zpětných odkazů, naopak se vyskytují nevhodné „dopředné“ odkazy (viz např. konec podkapitoly 4.1 s odkazem na podkapitolu 4.6). Např. zpětný odkaz lze využít místo rovnice eq. 19 (str. 60) s odkazem na eq. 2 (str. 22), které jsou identické.

Mezi pododstavce 4.3.3 a 4.3.4 je zařazen ještě odstavec označen 3.1.1 (!), který není uveden ani v obsahu práce. Nicméně v odstavci 3.1.1. je srovnání hodnot veličin dynamické viskozity při nulovém tlaku a kinematické viskozity, o nichž se tvrdí, že jsou „téměř identické“. Bylo by vhodné uvést například, že v celém měřeném rozsahu M_w se neliší o více než $\pm X\%$. V tomto závěru musí být zohledněny také chyby měření. Je přihlíženo na praktické hledisko, ale není uvedeno, které z obou měření je méně náročné na přípravu vzorku, čas měření, vyhodnocení, atp.

V tabulkách tab. 3-5 jsou vzorky řádně očíslovány, bohužel jejich čísla již nejsou uváděna dále při experimentálních výsledcích.

V odstavci 4.3.4 na obrázku fig. 38 je důležité srovnání viskozity HA v různých rozpouštědlech. Pro toto srovnání by bylo vhodné hodnoty normovat k jedné (pro nejmenší M_w není rozdíl z grafu patrný), uvést chybové úsečky a pak provést vyhodnocení. Obdobně to platí pro data z grafu na obrázku fig. 39.

Rovnice eq. 20 uvedená v odstavci 4.4 a její popis patří do části teoretické (že „ μ_0 je koeficient“ je nic neříkající). Uvedení příkladu konkrétního výpočtu by přispělo k vysvětlení, neboť z tohoto zápisu není jasné, jak jsou modelová data a křivky získána (např. pro fig. 40 a 41, kde jsou navíc data nečitelná, protože navzájem splývají). Jak se liší modelový výpočet pro PBS a vodu není také uvedeno. Navíc model sleduje viskozitu jako závislost na teplotě, proto musí být na levé straně rovnice, nikoliv v exponentu.

Přínos práce a celkový dojem.

Práce se zabývá prakticky využitelnou tematikou a bezesporu přináší řadu zajímavých experimentálních výsledků, které lze využít při výrobě, zpracování a skladování HA. Hlavním přínosem práce je, jak autorka v závěru sama přiznává, velké spektrum charakterizovaných vzorků HA. Předložená práce přináší nové dosud nepublikované výsledky. Autorka práce se podílí jako spoluautor na dalších

publikacích a patentových přihláškách. Jako netolerovatelný fakt lze považovat to, že autorka při své práci zanedbává jakékoliv začlenění a zhodnocení chyb měření, které mohou mít značný vliv na vyhodnocení a interpretaci výsledků.

Je velice škoda, že se autorka ve své práci nevyvarovala četných a více zbytečných chyb, které ubírají na celkovém dojmu při čtení zprávy. Disertační práce má, mimo jiné, sloužit také jako učební text pro studenty nižších ročníků, z tohoto pohledu práce studenta s oborem seznamuje nepříliš čtivou a komplikovanou cestou.

Otázky pro autorku práce.

1. Jak se odvodí dynamická viskozita (rovnice 1) na základě představy o silovém (tlakovém) působení na kapalinu a měření rychlosti vyvolané deformace? Na příkladu objasněte veličiny s jejich skalární, vektorovou, tenzorovou a dynamickou podstatou.
2. Jaký je rozdíl mezi metodami SLS a DLS z pohledu charakterizace velikosti částic v roztoku? Která z metod je vhodnější? Je výsledek ovlivněn koncentrací částic v roztoku?
3. Jakým způsobem se vyhodnocují chyby přímých a nepřímých měření? Uveďte příklady na Vámi měřených veličinách.
4. Jak Vy sama hodnotíte vlastní práci? Jaké navrhuje doporučení dalších cílů a postupů pro studium roztoků HA?
5. Práce je přínosem pro „mnoho aplikací“. Jmenujte několik, s kterými jste se přímo setkala, nebo které můžeme očekávat v krátké budoucnosti.

Závěr.

I přes četné a více formální nedostatky disertační práce uspokojivě demonstruje schopnosti autorky Mgr. Heleny Bilerové pro vědeckou a zejména experimentální práci. Byla získána řada zajímavých publikovatelných a navíc patentovatelných výsledků. Předložená práce bezesporu přispívá k rozvoji daného vědního oboru, výrobním postupům i praktickým aplikacím. Na závěr lze tedy konstatovat, že předložená disertační práce splňuje požadavky na závěrečnou práci pro udělení titulu Ph.D.

V Dolní Dobrouči dne 8. 9. 2012,

Ing. Marek Pokorný, Ph.D.
Contipro Biotech s.r.o.
561 02 Dolní Dobrouč